

台風 Ketsana(2009)による洪水時のマニラの環境水中の病原レプトスピラの検出系比較

東北大学 非会員 ○沼澤 聡

東北大学大学院 学生会員 今井崇博

東北大学大学院 学生会員 山口 諒

東北大学大学院 正会員 真砂佳史

東北大学大学院 フェロー会員 大村達夫

1. 背景と目的

2009 年の 9 月末にフィリピンのマニラ首都圏を襲った台風 Ketsana (フィリピン名: Ondoy) は過去 40 年間で最も深刻な洪水を引き起こし、多くの人々が長期間にわたり冠水した環境での生活を余儀なくされた。この事態に際して、汚染された環境水や土壌を介して伝播する細菌性人獣共通感染症であるレプトスピラ症が流行し大きな被害をもたらした。2009 年 10 月 1 日から 11 月 19 日までに、マニラ首都圏でレプトスピラ症と診断された人数が 2,299 名、レプトスピラ症で死亡した人数が 178 名と報告された¹⁾。

感染症の予防・抑制には、流行状況の正確な把握が不可欠である。現在、医療機関において感染者数の報告が行われているが、医療機関による報告は患者が発生してから確定診断をした上で行われるため、迅速性に欠ける。感染症の予防・抑制などの観点から迅速かつ正確に流行状況を把握するには、環境試料から病原微生物を検出することが有効であると考えられる。

環境水中の病原性微生物を検出する方法として、採取した環境水を濃縮後、核酸を抽出し、PCR 法を用いて対象微生物を検出することが一般的であり、良好な結果を得るためには環境サンプルに最適な PCR 検出系の確立が何よりも重要である。本研究では、フィリピンの洪水域で水試料を採取し、病原性レプトスピラ遺伝子の検出を行った。検出には、レプトスピラを対象とした既存の 2 種の TaqMan PCR 法を用い、検出感度の比較を行った。

2. 実験方法

2. 1. 水試料の採取

2009 年の 10、11、12 月の計 3 回にわたり、フィリ



図 1 各サンプリング地点

ピンのマニラ首都圏の洪水域 12 地点、及び河川 6 地点において水試料 (40ml) を採取し、採取後-20℃で保存した。洪水域は時間の経過とともに減少したため、各回を合計して洪水試料計 28 試料と河川水試料計 11 試料を取得した (図 1)。

2. 2. 濃縮

手法は Ganoza ら²⁾に従った。水試料を室温で 3,000×g 30 分間遠心分離し、上清を取り除いて得られたペレットに滅菌超純水を少量加えて、これを濃縮溶液とした。

2. 3. DNA 抽出および RNA 抽出

濃縮溶液から QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)、RNeasy Protect Bacteria Mini Kit (Qiagen) を用いて、それぞれ DNA、RNA を抽出した。手順は製品のプロトコールに従った。

2. 4. 逆転写反応

RNA 抽出溶液から iScript cDNA Synthesis kit (Bio-Rad) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を作

Key words : レプトスピラ、台風 Ketsuna、レプトスピラ症、定量 PCR、16S rRNA

連絡先: 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-06、 TEL: 022-795-7483、E-mail: numazawa@water.civil.tohoku.ac.jp

表 1 各プライマー及びプローブ配列

プライマー領域	プライマー プローブ	ヌクレチド配列(5'-3')
16S rRNA遺伝子 ³⁾	LeptoF	5' CCCGCGTCCGATTAG 3'
	LeptoR	5' TCCATTGTGGCGRA/GACAC3'
	LeptoP	5'(FAM) CTCACCAAGGCGACGAT -CGGTAGC228 3' (TAMRA)
LipL32遺伝子 ⁴⁾	LipL32-45F	5'AAGCATTACCGCTTGTGGTG3'
	LipL32-286R	5'GAAGTCCCATTTTCAGCGATT3'
	LipL32-189P	5'(FAM)AAAGCCAGGACAAGC -GCCG(BHQ)3'

成した。

2. 5. 遺伝子検出

以下に示す3つのTaqMan PCR法で病原性レプトスピラ遺伝子を検出した。用いたプライマーおよびプローブ配列を表1に示す。

検出系①:病原性レプトスピラの16S rRNA 遺伝子を対象とした³⁾。

検出系②:病原性レプトスピラのみが持つ表面タンパク質 LipL32 遺伝子を対象とした⁴⁾。

検出系③:検出系①と同じプライマーおよびプローブを用い³⁾, RT-PCR 法により 16S rRNA を検出対象とした。

2. 6. TaqMan PCR 法による遺伝子検出

TaqMan PCR は、CFX96 (BIO RAD) を用いて行った。PCR 反応液は、DNA 抽出溶液または cDNA 溶液を 5μl、2×super Mix を 12.5μl、プライマーの最終濃度 0.5 pmol/μl、プローブの最終濃度 0.2 pmol/μl、滅菌超純水を用いて全量 25μl となるように調整した。増幅プロトコールは、95℃3 分の後に、95℃15 秒、60℃ (検出系①、③) または 58℃ (検出系②) 30 秒、72℃ 15 秒 (蛍光取得) を 40 サイクル行った。

3. 結果と考察

DNA を検出対象とした検出系①および②では、すべてのサンプルで蛍光を検出することができなかった。この理由として、環境水中の病原性レプトスピラは非常に低濃度で存在するため、1つの細胞に最大数個しかない DNA を対象した場合は検出下限値以下であったと考えられる。一方、16S rRNA を検出対象とした検出系③では、全 39 サンプル中 36 サンプルから蛍光を検出することができた。この理由としては、検出対象の 16S rRNA は1つの細胞の中にリボソームの個数分だけ多数存在しているためと考えられる。このことから環境水中に存在する病原性レプトスピラを DNA を対象とした検出系を用いて検出するこ

とは困難であり、16S rRNA を対象とした検出系が有効であることがわかった。

採取時期ごとの検出頻度、陽性試料の検出濃度について、台風が去った直後の10月と約1ヶ月後の11月、約2ヶ月後の12月を比較した。10月は12地点中11地点が、11月は12地点中10地点が、12月は4地点中4地点が陽性となり、すべての時期で病原性レプトスピラが検出された。11月に陽性であった10地点中7地点で、10月と比較して検出濃度増加が見られた。この理由として、水の蒸発散によって病原性レプトスピラが濃縮されたため、またはレプトスピラの保菌者であるネズミなどが洪水域の環境水中に尿と共に病原性レプトスピラを排出したためなどが考えられる。これらのことより、洪水域の環境水中には台風後の約2ヶ月間以上にわたり病原性レプトスピラが存在していたことが確かめられた。

4. 終わりに

環境水中の病原性レプトスピラを検出する上で、16S rRNA を検出対象とすることが有効であると確認された。台風 Ketsana に伴うフィリピンのマニラ首都圏の洪水域の環境水には、病原性レプトスピラが長期間にわたり存在していたことが確認され、当該地区でのレプトスピラ症蔓延の1つの要因として、環境水を介した病原性レプトスピラの感染拡大が示唆された。

謝辞

本研究の一部は、新興・再興感染症研究拠点形成プログラム (文部科学省)「フィリピン・東北大学拠点 (研究代表者: 押谷仁)」および東北大学若手研究者萌芽研究育成プログラム (研究代表者: 真砂佳史) の補助を受けて行われた。

参考文献

- 1) Natonal Disaster Coordinating Council Philippines, 52, (2009). http://210.185.184.53/ndccWeb/index.php?option=com_content&task=view&id=175&Itemid=226
- 2) Ganoza et al.: PLoS Med., 3, 8, ppe308-e320 (2006)
- 3) Smythe et al.: BMC Inf. Dis., 2, pp. 13-20 (2002)
- 4) Stoddard et al.: Diag. Micro. Inf. Dis., 64, 3, pp. 247-255 (2009)